

EXPRESS MAIL NO. EL652176582US

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: Aurora Brieva DELGADO, et al.)	Re: Claim to Priority
)	
U.S. Appln. No.: not yet assigned)	Group: not yet assigned
)	
U.S. Filing Date: concurrently herewith)	Examiner: not yet assigned
)	
International Application No: PCT/ES99/00338)	
International Filing Date: 21 October 1999)	Our Ref.: B-4275PCT 618999-1
)	
For: "PHARMACOLOGICALLY ACTIVE POLYPEPTIDE GLYCOCONJUGATES")	Date: August 13, 2001

35 U.S.C. 119 CLAIM TO PRIORITY

Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231

Attn: United States Designated/Elected Office (DO/EO/US)

Sir:

Prior PCT International Application No. PCT/ES99/00338,
designating the U.S., claims foreign priority as follows:

<u>COUNTRY</u>	<u>FILING DATE</u>	<u>SERIAL NUMBER</u>
SPAIN	26 February 1999	P9900408

The certified copy has been filed in prior PCT International Patent Application No. PCT/ES99/00338.

Applicant hereby confirms that this claim for priority applies to the above-identified U.S. International stage application.

Respectfully submitted,

John Palmer
Reg. No. 36,885
Attorney for Applicant
LADAS & PARRY
5670 Wilshire Boulevard #2100
Los Angeles, California 90036
(323) 934-2300

THIS PAGE BLANK (USPTO)

OFICINA ESPAÑOLA

de

PATENTES y MARCAS

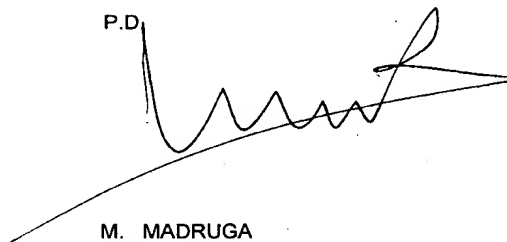
CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 9900408, presentada en este Organismo, con fecha 26 de Febrero de 1999.

Madrid, 19 de noviembre de 1999

El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica.

P.D.



M. MADRUGA



THIS PAGE BLANK (USPTO)


**OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y
MARCAS**
INSTANCIA DE SOLIC.
☒ **PATENTE DE INVENCION** ☐ **MODELO**

NUMERO DE SOLICITUD
P 9 9 0 0 4 0 8
FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN O.E.P.M.
20 FEB 26 13:21
FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(1)	<input type="checkbox"/> SOLICITUD DE ADICION <input type="checkbox"/> SOLICITUD DIVISIONAL <input type="checkbox"/> CAMBIO DE MODALIDAD <input type="checkbox"/> TRANSFORMACION SOLICITUD EUROPEA	(2) EXPEDIENTE	MODALIDAD NUMERO SOLICI FECHA SOLICIT. MODALIDAD NUMERO SOLICITUD FECHA SOLICITUD	(3) LUGAR DE PRESENTACION	CODIGO
				MADRID	[2, 8]

(4) SOLICITANTE(S)	APELLIDOS O DENOMINACION JURIDICA	NOMBRE	DNI
	INDUSTRIAL FARMACEUTICA CANTABRIA, S.A.		A-39000914

(5) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE			
DOMICILIO Carretera de Cazaña-Adarzo s/n			
LOCALIDAD	SANTANDER	TELEFONO	
PROVINCIA	SANTANDER	CODIGO POSTAL	[3, 9, 0, 1, 1]
PAIS RESIDENCIA	ESPAÑA	CODIGO PAIS	[E, S]
NACIONALIDAD	ESPAÑOLA	CODIGO NACION	[E, S]

(6) INVENTOR(ES)	<input type="checkbox"/> EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR <input checked="" type="checkbox"/> EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O UNICO INVENTOR	(8) MODO DE OBTENCION DEL DERECHO	
		<input checked="" type="checkbox"/> INVENC. LABORAL <input checked="" type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESION	
APELLIDOS	NOMBRE	NACIONALIDAD	COD. NACION
BRIEVA DELGADO	Aurora	Española	ES
GARCIA VILLARRUBIA	Vicente	Española	ES
GUERRERO GOMEZ-PAMO	Antonio	Española	ES

(9) TITULO DE LA INVENCION
"GLICOCONJUGADOS DE POLIPEPTIDOS FARMACOLOGICAMENTE ACTIVOS"

(10) INVENCION REFERENTE A PROCEDIMIENTO MICROBIOLOGICO SEGUN ART. 25.2 L.P.	<input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO
--	--

(11) EXPOSICIONES OFICIALES	OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Dpto. SECRETARIA GENERAL REPROGRAFIA Panamá, 1 - Madrid 28071
LUGAR	FECHA

(12) DECLARACIONES DE PRIORIDAD			
PAIS DE ORIGEN	COD. PAIS	NUMERO	FECHA

(13) EL SOLICITANTE SE ACOGE A LA EXENCION DE PAGO DE TASAS PREVISTA EN EL ART. 162 L.P.	<input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO
--	--

(14) REPRESENTANTE	APELLIDOS	NOMBRE	CODIGO
	GARCIA-CABRERIZO Y DEL SANTO	PEDRO MARIA	[8, 8, 9, 3]
DOMICILIO	LOCALIDAD	PROVINCIA	COD. POSTAL
C/. Vitruvio nº 23	MADRID	MADRID	[2, 8, 0, 0, 6]

(15) RELACION DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN	FIRMA DEL FUNCIONARIO
<input checked="" type="checkbox"/> DESCRIPCION. N.º DE PAGINAS... 29 <input checked="" type="checkbox"/> REIVINDICACIONES. N.º DE PAGINAS... 1 <input checked="" type="checkbox"/> DIBUJOS. N.º DE PAGINAS... <input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN <input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE PRIORIDAD <input type="checkbox"/> TRADUCCION DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD	<input checked="" type="checkbox"/> DOCUMENTO DE REPRESENTACION <input type="checkbox"/> PRUEBAS <input checked="" type="checkbox"/> JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASAS <input checked="" type="checkbox"/> HOJA DE INFORMACIONES COMPLEMENTARIAS <input type="checkbox"/> OTROS
FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE	

(16) NOTIFICACION DE PAGO DE LA TASA DE CONCESION
Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión: para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 10-10-86.

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
CUMPLIMENTAR LOS TRES EJEMPLARES SALVO ZONAS EN ROJO



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

NÚMERO DE SOLICITUD

P9900408

FECHA DE PRESENTACION

HOJA INFORMACIONES COMPLEMENTARIAS

- ☒ PATENTE DE INVENCION
☐ MODELO DE UTILIDAD

(4) SOLICITANTES	APELLIDOS O RAZON SOCIAL	NOMBRE	DNI
	INDUSTRIAL FARMACEUTICA CANTABRIA, S.A.		A-39000914

(6) INVENTORES	APELLIDOS	NOMBRE	NAC.
	PIVEL RANIERI GIMENEZ GALLEGO MATJI Y TUDURI	JUAN PABLO GUILLERMO JOSE ANTONIO	ES ES ES

(11) EXPOSICIONES OFICIALES

LUGAR:

FECHA:

(12) DECLARACIONES DE PRIORIDAD

PAIS DE ORIGEN

CODIGO

NUMERO

FECHA



PATENTE

RESUMEN Y GRAFICO

NUMERO DE SOLICITUD

P9900408

FECHA DE PRESENTACION

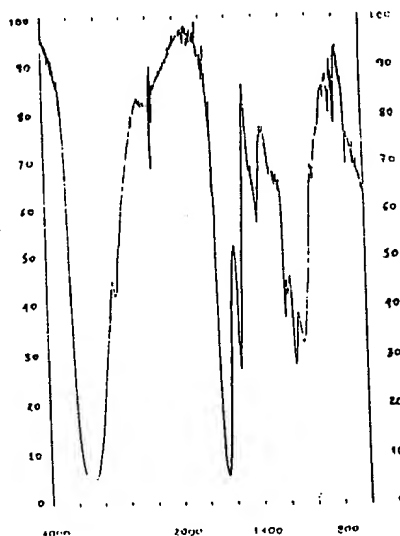
20 FEB 26 1971

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

GLICOCONJUGADOS DE POLIPEPTIDOS FARMACOLOGICAMENTE ACTIVOS

Glicoconjugados de polipéptidos farmacológicamente activos con una determinada secuencia de consenso y estabilidad físico-química poseyendo una actividad in vivo que no es propia de los componentes aislados, con relevancia farmacológica y clínica, en función de su actividad inmunomoduladora. Con este fin son preparados para su uso en medicina humana y animal. Fig. 1

GRAFICO





(31) NÚMERO

(32) FECHA

(33) PAÍS

A1

(12) PATENTE DE INVENCION

(21) NÚMERO DE SOLICITUD

(22) FECHA DE PRESENTACIÓN
26-Febrero-1.999

(71) SOLICITANTE(S)

INDUSTRIAL FARMACEUTICA CANTABRIA, S.A.

NACIONALIDAD

ESPAÑOLA

DOMICILIO:

Carretera de Cazoña-Adanzo s/n 39011-SANTANDER

(72) INVENTOR(ES) Aurora BRIEVA DELGADO, Vicente GARCIA VILLARRUBIA, Antonio GUERRERO GOMEZ-PAMO, Juan Pablo PIVEL RANIERI, quienes ceden sus derechos por relación laboral, Guillermo GIMENEZ GALLEGO y José Anto-

(73) TITULAR(ES) MIO MATJI y TUDURI, quienes ceden sus derechos a la firma - solicitante en virtud de contrato.

(11) N° DE PUBLICACIÓN

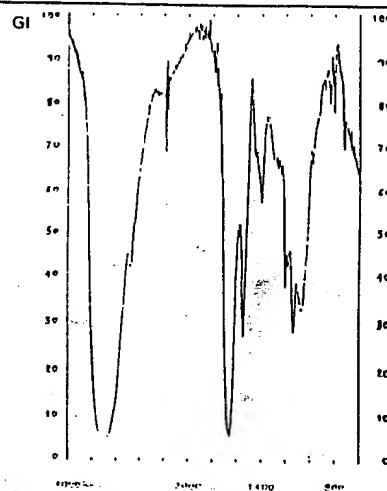
(45) FECHA DE PUBLICACIÓN

(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA

(51) Int. Cl.

(54) TÍTULO

"GLICOCONJUGADOS DE POLIPEPTIDOS FARMACOLOGICAMENTE ACTIVOS"



(57) RESUMEN (APORTACIÓN VOLUNTARIA SIN VALOR JURÍDICO)

GLICOCONJUGADOS DE POLIPEPTIDOS FARMACOLOGICAMENTE ACTIVOS

Glicoconjugados de polipéptidos farmacológicamente activos -- con una determinada secuencia de consenso y estabilidad físico-química poseyendo una actividad in vivo que no es propia de los componentes aislados, con relevancia farmacológica y clínica, en función de su actividad inmunomoduladora. Con este fin son preparados para su uso en medicina humana y animal. Fig. 1

GLICOCONJUGADOS DE POLIPÉPTIDOS FARMACOLÓGICAMENTE ACTIVOS

DESCRIPCION

El conocimiento creciente en relación a los mecanismos de funcionamiento y regulación del sistema inmunológico ha planteado en los últimos años la posibilidad de modular terapéuticamente su funcionalidad.

La gran diversidad de sustancias de distinto origen, natural y sintético, capaces de modular algún mecanismo inmunológico se debe, en parte a la enorme posibilidad de reconocimiento de sustancias ajenas al organismo que le es propio. En (GH Werner, P Follés "Immunostimulating agents: what next?. A review of their present and potential medical applications." Eur. J. Biochem 242, 1-19 (1996)) se describen alguno de los productos de desarrollo recientes así como sus posibles implicaciones terapéuticas.

De entre los mediadores endógenos uno cuyo control plantea uno de los desafíos terapéuticos más importantes es el factor de necrosis tumoral (TNF). Esta molécula presenta unas características diferenciadas especiales (R: Ksontini, SLD MacKay, LL Moldawer "Revisiting the role of tumor necrosis factor α and the response to surgical injury and inflammation" Arch. Surg. 133, 558-567 (1998). JL Alonso "La compleja fisiología del factor de necrosis tumoral." Inmunología 8, (3) 73-94 (1989). T. Calandra "Importance des cytokines dans les syndromes septiques." Med. Hyg. 49, 609-614 (1991). A Eigler, B Sinha, G Hartman, S Endres "Taming TNF: strategies to restrain this pro inflammatory cytokines." Immunology Today 18,487-492 (1997). R González-Amaro, C García-Monzón, L García-Buey, R Moreno-Otero, JL Alonso, E Yagüe, JP Pivel, M López-Cabrera, E Fernández-Ruiz, F Sánchez-Madrid "Induction of Tumor Necrosis Factor α Production by Human Hepatocytes in Chronic Viral Hepatitis." J. Exp. Med 179, 841-848 (1994).):

El factor de necrosis tumoral (TNF) es una citoquina pleiotrópica, dado el gran número de células que responden a ella. Producida normalmente por monocitos, presenta dos formas activas, una ligada a la membrana de la célula secretora, y otra libre, consecuencia del procesamiento de la anterior por una metaloproteinasa, la enzima convertidora del factor de necrosis tumoral o TACE.

Asimismo también está documentada la participación de otras células distintas de monocitos en la síntesis de TNF α , tales como linfocitos T.

- (AG Santis, MR Campanero, JL Alonso, F Sánchez-Madrid "Regulation of tumor necrosis factor (TNF)- α synthesis and TNF receptors expression in T lymphocytes through the CD2 activation pathway." Eur. J. Immunol. 22, 3155-3160 (1992). AG Santis, MR Campanero, JL Alonso, A Tugores, MA Alonso, E Yagüe, JP Pivel, F Sánchez-Madrid "Tumor necrosis factor- α production induced in T lymphocytes through the AIM/CD69 activation pathway." Eur. J. Immunol 22, 1253-1259 (1992).) y células NK (I Melero, MA Balboa, JL Alonso, E Yagüe, JP Pivel, F Sánchez-Madrid, M Lopez-Botet "Signaling through the LFA-1 leucyte integrin actively regulates intercellular adhesion and tumor necrosis factor- α production in natural killer cells." Eur. J. Immunol. 23, 1859-1865 (1993).).

Existen un número de moléculas que inducen la producción de TNF tales como la endotoxina bacteriana o lipopolisacárido (LPS), superantígenos de origen bacteriano, viral o de células superiores, e incluso otras citoquinas.

- El TNF, similarmente a otras citoquinas, actúa de una manera no enzimática, a concentraciones en el orden nano a femtomolar, tanto a nivel de la propia célula secretora (actividad autocrina) como sobre células adyacentes (actividad yuxtacrina) como sobre tejidos vecinos (actividad paracrina) o distantes (actividad endocrina). Esto supone que la actividad de esta molécula, al igual que la de otras citoquinas, está muy influenciada por el "status" de la célula receptora y por su interacción, entre otras, con la matriz extracelular.

Así, en distintas situaciones se ha encontrado que el TNF circulante no es siempre el parámetro fundamental, pues si bien éste puede ser normal, pueden haber niveles locales muy elevados de esta citoquina.

- Se han descrito, en distintos tipos celulares, dos receptores, denominados receptores de TNF p55 (TNFR p55) y p 75 (TNFR p75).

- La interacción de estos receptores con el TNF libre o el ligado da lugar a un espectro variado de respuestas, que se pueden englobar en tres grandes grupos: Por un lado la activación de la cascada inflamatoria, dado que TNF pertenece a un grupo de proteínas relacionadas con ésta, entre las que están IL1, IL6, GM-CSF, etc. Por otro lado, la activación de la respuesta de mediación celular frente a la agresión patogénica, especialmente por patógenos intracelulares. Y, por un tercero, la apoptosis, o muerte celular programada, manifestada especialmente en células tumorales. Sin embargo, en respuesta apoptótica, TNF manifiesta una respuesta dual, ya que por un lado, la activación por TNF del factor de transcripción NF κ B puede proteger a algunas poblaciones celulares de la muerte durante una infección aguda, pero, sin embargo, la hiperproducción de TNF

- puede llevar a muerte por apoptosis. Como consecuencia de lo anterior, TNF se ve implicado en distintas patologías. La relación entre su superproducción, local y/o sistémica, y el desencadenamiento y mala evolución de muchos procesos patológicos está ampliamente documentada (R Ksontini, SLD MacKay, LL Moldawer "Revisiting the role of tumor necrosis factor α and the response to surgical injury and inflammation" Arch. Surg. 133, 558-567 (1998). JL Alonso "La compleja fisiología del factor de necrosis tumoral." Inmunología 8, (3) 73-94 (1989). T. Calandra "Importance des cytokines dans les syndromes septiques." Med. Hyg. 49, 609-614 (1991). A Eigler, B Sinha, G Hartman, S Endres "Taming TNF: strategies to restrain this pro inflammatory cytokines." Immunology Today: 18,487-492 (1997). R González-Amaro, C García-Monzón, L García-Buey, R Moreno-Otero, JL Alonso, E Yagüe, JP Pivel, M López-Cabrera, E Fernández-Ruiz, F Sánchez-Madrid "Induction of Tumor Necrosis Factor α Production by Human Hepatocytes in Chronic Viral Hepatitis." J. Exp. Med 179, 841-848 (1994).). La producción de TNF por distintos tipos celulares contribuye además al papel que tiene esta citoquina en el desarrollo de variadas situaciones patológicas que incluyen por ejemplo lesiones en piel y en intestino, asociadas a la reacción injerto huésped (PF Piguet, GE Grau, B Allet, P Vassalli. "Tumor Necrosis Factor/Cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of GRAFT-VS-HOST disease." J.Exp. Med. 166,1280-1289 (1987).), la *pneumocistosis* (CE Reed. "Hypersensitivity pneumonitis and occupational lung disease from inhaled endotoxin." Immunology and Allergy Clinics of North America. 12 N° 4(1992)) o patologías neurológicas (SW Barger "Tumor Necrosis Factor. The Good, the Bad and the Umbra." Neuroprotective Signal Transduction. Edited by M.P.Mattson Humana Press Inc. Totowa NJ.), patologías pulmonares, patologías crónicas (como enfermedad inflamatoria intestinal y artritis reumatoide) y sepsis. Esta citoquina presenta también un papel muy importante en dos patologías de gran incidencia: asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (P. Norman "Pulmonary diseases. Disease trends and market opportunities" Financial Times Pharmaceuticals Management Reports (1999)).

Todos estos antecedentes plantean la dificultad del diseño de terapias efectivas basadas en el control del TNF en distintas situaciones patológicas.

- El diseño de nuevos fármacos exige el establecimiento y puesta a punto de modelos farmacológicos experimentales que reproduzcan los aspectos más importantes de la patología en cuestión. Uno de los modelos más

empleados en la búsqueda de fármacos capaces de controlar la producción de TNF es el modelo murino de inducción sistémica de TNF por endotoxina bacteriana (LPS). Otros modelos ampliamente usados son aquellos en los que se estudia la estimulación *in vitro* de células pertenecientes al linaje granulocito-macrófago, para la producción de dicha citoquina.

- Uno de los aspectos más llamativos desde el punto de vista científico es la gran diversidad química de productos a los que se les adjudica la capacidad de controlar la hiperproducción de TNF en distintos modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*. Entre ellos se pueden mencionar antioxidantes
- 10 (N Satomi, A Sakurai, R Haranaka, K Haranaka. "Preventive Effects of Several Chemicals Against Lethality of Recombinant Human Tumor Necrosis Factor." *Journal of Biological Response Modifiers*. 7,54-64 (1988).), cannabioides (R Gallily, A Yamin, Y Waksman, H Ovadia, J Weidenfeld, A Bar-Joseph, A Biegon, R Mechoulam, E Shohami. "Protection against Septic Shock and Suppression
- 15 of Tumor Necrosis Factor α and Nitric Oxide Production by Dexanabinol (HU-211), a Nonpsychotropic Cannabinoid." *The Journal of Pharmacol. and Experimental Therapeut.* 283: 918-924 (1997).), IL-10 (SR Smith, C Terminelli, G Denhardt, S Narula, G Jeanette Thorbecke. "Administration of Interleukin-10 and the Time of Priming Protects *Corynebacterium parvum* Primed Mice against LPS-
- 20 and TNF- α Induced Lethality." *Cellular Immunology* 173: 207-214 (1996).), Thalidomida (AL Moreira, J Wang, EN Sarno, G Kaplan. "Thalidomide protects mice against LPS-induced shock." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30: 1199-1207 (1997). SM McHugh, TL Rowland "Thalidomide and derivatives: immunological investigations of tumour necrosis factor-alpha (TNF- α). inhibition suggest drugs capable of selective gene regulation." *Clin Exp. Immunol* 110: 151-154 (1997). JD Klausner, VH Freedman, G Kaplan "Thalidomide as an Anti-TNF- α Inhibitor: Implications for Clinical Use." *Clinical Immunology and Immunopathology*. 81, 219-223 (1996).), Chlorpromacina (M. Gadina, R. Bertini, M. Mengozzi, M. Zandalasini, A. Mantovani and P. Ghezzi. "Protective Effect of
- 30 Chlorpromazine on Endotoxin Toxicity and TNF Production in Glucocorticoid-Sensitive and Glucocorticoid-Resistant Models of Endotoxic Shock." *J. Exp. Med.* 273, 1305-1310 (1994).), Benzidamina (A. Guglielmotti, L. Aquilini, M.T. Rosignoli, C. Landolfi, L. Soldo, I. Coletta and M. Pinza "Benzidamine protection in a mouse model of endotoxemia." *Inflamm. Resp.* 46, 332-335 (1997).),
- 35 hidrazinsulfato (R. Silverstein, B.R. Turley, C.A. Christoffersen, D.C. Johnson and D.C. Morrison "Hydrazine Sulfate Protects D-Galactosamine-sensitized Mice

against Endotoxin and Tumor Necrosis factor/Cachectin Lethality: Evidence of a Role for the Pituitary." J.Exp. Med. 173, 357-365 (1991).) y extractos naturales (H.Ueda and M. Yanazaki "Inhibition of Tumor Necrosis Factor- α Production by Orally Administering a Perilla Leaf Extract." Biosci. Biotech. Biochem. 61,1292-1295 (1997).).

Asimismo, en el estudio de situaciones clínicas en pacientes con patologías en las que se sabe que el TNF juega un papel en relación a su evolución se ha estudiado el efecto de distintos principios activos en la regulación de la producción de TNF, *in vitro*, por parte de monocitos aislados de sangre periférica. Entre ellos podemos mencionar ciprofloxacina (S Bailly, M Fay, B Ferrua, MA Gougerot-Pocidallo "Ciprofloxacin treatment *in vivo* increases the *ex vivo* capacity of lipopolysaccharide-stimulated human monocytes to produce IL-1, IL-6 and tumour necrosis factor-alpha." Clin. Exp. Immunol. 85, 331-334 (1991).), rolipram (J Semmler, H Wachtel, S Endres "The specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram suppresses Tumor Necrosis Factor- α production by human mononuclear cells." Int. J. Immunopharmac. 15,409-413 (1993).), vesnarinona (T Kambayashi, N Mazurek, ChO Jacob, N Wei, M Fong, and G Strassmann. "Vesnarinone is a selective inhibitor of Macrophage TNF- α release." Int. J. Immunopharmac. 18,371-378 (1996).), análogos de prostaciclina (A Jörres, H Dinter, N Topley, GM Gahl, U Frei, P Scholz. "Inhibition of Tumour Necrosis Factor production in endotoxin-stimulated human mononuclear leukocytes by the prostacyclin analogue iloprost: Cellular Mechanisms." Cytokine 9,119-125 (1997).), pentoxifilina (BJ Dezube, ML Sherman, JL Fridovich-Keil, J Allen-TjRyan, A B Pardee. "Down-regulation of tumor necrosis factor expression by pentoxifylline in cancer patients: a pilot study." Cancer Immunol Immunother 36: 57-60 (1993).). Un caso especial es la mención de los corticoides en función de su conocida relación de inhibición del gen TNF (S Abe, T Yamamoto, S Iihara, M Yamazaki, D Mizuno. "A possible role of glucocorticoids: an intrinsic inhibitor of the cytotoxic activity of Tumor Necrosis Factor." Jpn. J. Cancer Res. (Gann) 79: 305-308 (1988). J Han, P Thompson, B. Beutler "Dexamethasone and Pentoxifylline Inhibit Endotoxin-induced Cachectin/Tumor Necrosis Factor Synthesis at Separate Points in the Signaling Pathway." J. Exp. Med. 172, 391-394 (1990). JMH Debets, TJM Ruers, MPMH Van Der Linden, CJ Van den Linder, WA Buurman. "Inhibitory effect of corticosteroids on the secretion of tumour necrosis factor (TNF) by monocytes is dependent on the stimulus inducing TNF synthesis." Clin Exp. Immunol. 78: 224-229 (1989).). Merece ser

- destacado que la modulación de niveles de citoquinas se menciona ya como una "diana" específica en el diseño de nuevos fármacos (K Cooper, H Masamune "Cytokine Modulation as a Medicinal Chemistry Target." Annual Reports in Medicinal Chemistry 27, Chapter 22.). Otros intentos de controlar los efectos de esta citoquina, tanto en situación de sepsis como de colitis ulcerosa y de artritis reumatoide, tiene relación con el desarrollo de anticuerpos monoclonales anti TNF (A Trilla, P Alonso "Anticuerpos monoclonales en el tratamiento del shock séptico." Med. Clin. 99: 778-780 (1992). JG Sinkovics "Monoclonal antibodies in the treatment of endotoxin shock" Acta Microbiologica Hungarica 37: (1990). SB Porter "Current Status of Clinical Trials With Anti-TNF" Chest 112: 6 (1997). JR O'Dell "Anticytokine therapy. A new era in the treatment of rheumatoid arthritis" New Eng. J. Med. 340, 310-312 (1999). RA van Hogenzand, HW Verspaget "The future role of anti-tumor necrosis factor α products in the treatment of Crohn's disease" Drugs 56, 299-305 (1998). F Mackay, JL Browning, P Lawton, SA Shah, M Comiskey, AK Bhan, E Mizoguchi, C Terhorst, SJ Simpson "Both the lymphotoxin and tumor necrosis factor pathways are involved in experimental murine models of colitis" Gastroenterology 115: 1464-1475 (1998)). Sin embargo, y a pesar del amplio conocimiento acerca de esta citoquina, incluyendo su biología molecular, esto no ha permitido el desarrollo de agentes terapéuticos eficaces y seguros, en el control de su hiperproducción.

Un análisis crítico de todas estas posibles opciones terapéuticas indica que, por ejemplo en el caso de los monoclonales anti TNF, éstos no han resultado eficaces en el caso de patologías agudas y presentan gran variabilidad en su afinidad por la citoquina, aunque últimamente se han reportado casos exitosos en el caso de artritis reumatoide y de colitis ulcerosa (JR O'Dell "Anticytokine therapy. A new era in the treatment of rheumatoid arthritis" New Eng. J. Med. 340, 310-312 (1999). RA van Hogenzand, HW Verspaget "The future role of anti-tumor necrosis factor α products in the treatment of Crohn's disease" Drugs 56, 299-305 (1998).); otros productos presentan un perfil de toxicidad muy fuerte, como el caso de la Talidomida, o presentan una actividad principal que los hace de difícil manejo como ciprofloxacina o Rolipram. En otros casos hay ausencia de definición química, y por ende de reproducibilidad lote a lote, como los extractos. Finalmente, en el caso de los corticoides, inhibidores de la expresión del gen TNF, presentan un conjunto importante de contraindicaciones.

El conocimiento de los mecanismo funcionales del sistema immune

ha permitido en los últimos años el desarrollo de sustancias conocidas como inmunomoduladores. Existen situaciones patológicas en las que el recurso de los inmunomoduladores se hace especialmente importante, tales como enfermedades autoinmunes, con el correspondiente desequilibrio del sistema inmune, 5 inmunosupresión iatrogénica (como la producida en trasplantes, terapia antineoplásica o intervenciones quirúrgicas especialmente traumáticas) o medioambiental (producida por "stress" o por contaminación). Por otra parte, en muchos protocolos terapéuticos hoy se incluyen inmunomoduladores como adyuvantes a la terapia específica antioncogénica o antiinfecciosa (E Garaci, F 10 Pica, G Rasi, AT Palamara, C Favalli "Combination therapy with BRMs in cancer and infectious diseases" *Mechanisms of Ageing and Development* 96, 103-116 (1997)).

Dentro de los inmunomoduladores constituye un importante grupo aquellos diseñados con el objetivo de estimular mecanismos de inmunidad 15 natural, en particular la actividad NK o las actividades fagocitarias y microbidas del sistema mononuclear fagocítico. Entre ello se puede mencionar extractos bacterianos, BCG, *Corynebacterium parvum*, derivados del muramildipéptido, así como polisacáridos, especialmente glucanos extraídos de levaduras (A Aszalos "Immunostimulators of microbial origin" en "Antitumor compounds of natural origin" 20 CRC Press (1982)). Si bien las moléculas anteriormente descritas han demostrado su efectividad como activadores del sistema monocito-macrófago, así como una cierta eficacia como antitumorales, su administración conlleva dos efectos secundarios indeseados: Por un lado producen un bloqueo de los sistemas de metabolización hepáticos -propiedad que comparten con otras 25 sustancias inmunomoduladores y que dificultan su administración adyuvante con otras terapias, como antibióticos o citostáticos- y por otro, y muy especialmente, susceptibilizan a endotoxina bacteriana, pudiéndose dar el caso de que la endotoxina liberada por la acción antibiótica sea más tóxica para el paciente en presencia del adyuvante inmunológico (M Trautmann, R Zick, T Rukavina, AS 30 Cross, R Marre "Antibiotic-induced release of endotoxin: *In vitro* comparison of meropenem and other antibiotics" *J. Antimicrob. Chemother.* 41, 163-169 (1998)).

De lo antedicho se deduce que existe, por lo tanto, una estrecha ventana terapéutica consistente en encontrar productos capaces de inhibir selectivamente algunas acciones del TNF sin bloquear, o más aún estimulando, 35 la respuesta de inmunidad natural.

Dentro de los tipos de moléculas cuya utilización ha sido más

- controvertida están los inmunomoduladores de tipo peptídico. La controversia se basa en que si bien este tipo de moléculas presentan actividades muy prometedoras, tales como interacción específica con receptores, inhibición específica de otras proteínas como los inhibidores de proteasas, etc, presentan
- 5 problemas de biodisponibilidad, especialmente por vía oral, susceptibilidad a proteasas, vida media corta y desencadenamiento de reacciones alérgicas o anafilácticas. Una revisión muy reciente de péptidos y proteínas como
- 10 inmunomoduladores destacan estas características (JE Talmadge "Pharmacodynamic aspects of peptide administration biological response modifiers" Advanced Drug Delivery Reviews 33, 241-252 (1998)): "Varios
- 15 paradigmas distinguen la actividad terapéutica de proteínas en comparación con los clásicos fármacos de bajo peso molecular. Estas diferencias están predominantemente asociadas con los atributos farmacodinámicos de las proteínas. Así, esto es crítico tanto para entender la farmacología de estos
- 20 fármacos como para optimizar su actividad terapéutica, o más generalmente, para identificarla. Estos paradigmas incluyen:
- La corta vida media de las proteínas y el requerimiento de la administración subcutánea o por infusión continuada para obtener la máxima actividad.
 - La respuesta aparente en forma de campana.
 - 20 La necesidad de una administración crónica asociada con el mecanismo percibido de acción de dichas moléculas.
 - La actividad óptima de dichos agentes como terapia adyuvante administrada en conjunción con quimio y/o radioterapia y que
 - La máxima actividad inmunoterapéutica adyuvante se encuentra en pacientes con
 - 25 enfermedad residual mínima."

El objeto de la presente invención es el hecho de que determinados péptidos o proteínas, con características especiales físico-químicas, definidas por requisitos estructurales precisos, son capaces de formar conjugados no covalentes con determinadas moléculas de naturaleza polisacáridica, definidas

30 por unas características estructurales tales que hacen posible la formación de dichos conjugados y que estos conjugados presentan actividad por vía oral en la modulación de la respuesta inmune humana o animal. Esta modulación se traduce en la regulación o la baja de la producción de TNF inducido en determinadas condiciones experimentales, siendo asimismo capaces de estimular

35 el sistema mononuclear - fagocítico, de expandir el compartimiento granulocito-macrófago y no presentando inhibición de los sistemas de metabolización

hepáticos.

Es necesario destacar dos hechos que hacen particularmente importante el hecho objeto de la presente invención:

- El primero es que los conjugados no covalentes formados son activos por vía oral, constituyendo así una novedad en el campo de los péptidos biológicamente activos por dicha vía, y superando los inconvenientes de una manera original para dicha vía de administración. Estos inconvenientes quedan perfectamente descritos en los siguientes trabajos: BL Ferraiolo, LZ Benet "Peptides and proteins as drugs" *Pharmaceutical Research* 4, 151-194 (1985); FM Rollwagen, S Baqar "Oral cytokine administration" *Immunol. Today* 17, 548-550 (1996); Solis-Pereyra, N Aattouri, D Lemonnier "Role of food in the stimulation of cytokine production" *Am. J. Clin. Nutr.* 66, 521S-525S (1997); A Fasano "Innovative strategies for the oral delivery of drugs and peptides" *Trends in Biotech.* 16, 152-157 (1998); GM Pauletti, S Gangwar, TJ Siahaan, J Aubé, RT Borchardt "Improvement of oral peptide bioavailability: Peptidomimetics and prodrug strategies" *Adv. Drug Deliv. Rev.* 27, 235-256 (1997); JJ Hols, C Deacon, MB Toft-Nielsen, L Bjerre-Knudsen "On the treatment of diabetes mellitus with Glucagon-like peptide-1" *Ann. New York Acad. Sci.* 865, 336-343 (1998)). En este sentido hay que destacar que éste no es el único ejemplo de actividad de proteínas por vía oral (Y Nagao, K Yamashiro, N Hara, Y Horisawa, K Kato, A Uemura "Oral administration of IFN- α potentiates immune response in mice" *J. Interferon and Cytokine Res.* 18, 661-666 (1998); S Kaminogawa "Food allergy, oral tolerance and immunomodulation. Their molecular and cellular mechanisms" *Biosci. Biotech. Biochem.* 60, 1749-1756 (1996); H. Uwata, T-T Yip, K Yamauchi, S Teraguchi, H Hayasawa, M Tomita, T.W. Hutchens "The survival of ingested lactoferrin in the gastrointestinal tract of adult mice" *Biochem J.* 334, 321-323 (1998); J Xu-Amano, WK Aicher, T Taguchi, H Kiyono, JR McGhee "Selective induction of Th2 cells in murine Peyer's patches by oral immunization" *Internat. Immunol.* 4, 433-445 (1992)).
- El segundo es que están descritas complejos polisacárido-proteína, tanto covalentes como no covalentes, dotados de actividad biológica, pero que, a diferencia del objeto de la presente invención, se trata, en general, de asociaciones en las que la adición de determinados péptidos produce un incremento en la respuesta antigénica de polisacáridos débilmente inmunogénicos, consiguiendo, gracias a la asociación, una respuesta T dependiente frente a un antígeno polisacárido que solo es T independiente y

- de baja respuesta (H-K Guttormsen, LM Wetzler, RW Finberg, DL Kasper "Immunologic memory induced by a glycoconjugate vaccine in a murine adoptive lymphocyte transfer model" *Infection and Immunity* 66, 2026-2032 (1998); MA Avanzini, AM Carrè, R Macario, M Zecca, G Zecca, A Pession, P Comoli, M Bozzola, A Prete, R Esposito, F Bonetti, F Locatelli "Immunization with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in children given bone marrow transplantation: Comparison with healthy age-matched controls" *J. Clin. Immunol.* 18, 193-301 (1998); EFE Babiker, A Hiroyuki, N Matsudomi, H Iwata, T Ogawa, N Bando, A Kato "Effect of polysaccharide conjugation or transglutaminase treatment on the allergenicity and functional properties of soy protein" *J. Agric. Food Chem.* 46, 866-871 (1998)). Es de resaltar que, a diferencia de la presente invención, en los casos en los que se han descrito asociaciones polisacárido-proteína con actividad inmunomoduladora, estas asociaciones son covalentes y proceden de la misma fuente natural (K Noda, N Ohno, K Tanaka, M Okuda, T Yadomae, K Nomoto, Y Shoyama "A new type of biological response modifier from *Chlorella vulgaris* which needs protein moiety to show antitumour activity" *Phytotherapy Res.* 12, 309-319 (1998); D Sabolovic, L Galoppin "Effect of a protein bound polysaccharide (PS-K) on tumor development and infections in splenectomized rats and mice" *Int. J. Immunopharmac.* 8, 441-461 (1986)).

20 Para facilitar la mejor comprensión de las características de la invención, se va a realizar una descripción detallada de la misma.

La figura 1 muestra un ejemplo del espectro infrarrojo del glicoconjugado.

Esta invención describe la formación y propiedades farmacológicas de conjugados de determinadas polipéptidos, sustancialmente puros, y determinados polisacáridos, sustancialmente puros, para la manufactura de composiciones terapéuticas para el tratamiento de disfunciones inmunológicas, de infecciones y/o de tumores. Dichos conjugados son farmacológicamente activos, mientras que ninguno de sus componentes (polipéptido o polisacárido) presentan las actividades farmacológicas de los conjugados. Asimismo, dichos conjugados presentan distintas estequiometrias en la relación polisacárido polipéptido, siendo las actividades farmacológicas dependientes de dichas estequiometrias.

La descripción técnica de la presente invención consta de la siguientes partes: a) requisitos que deben cumplir las moléculas de naturaleza polisacarídica objeto de la presente invención; b) requisitos que deben cumplir las moléculas de naturaleza polipeptídica objeto de la presente invención; c) consecuencias de dichos requisitos: formación de los conjugados polisacárido-polipéptido; d) actividades biológicas de los conjugados polisacárido-polipéptido.

A) Requisitos que deben cumplir las moléculas de naturaleza polisacarídica objeto de la presente invención.

Las moléculas de naturaleza polisacarídica objeto de la presente invención deben cumplir los siguientes requisitos:

Su origen debe ser microbiano, no viral, y en especial originados en pared de levaduras. Su peso molecular promedio debe estar situado entre 50 y 250 Kda; estos polisacáridos deben ser solubles en agua o en medio salinos con fuerza iónica similar a la producida por soluciones de cloruro sódico de concentraciones comprendidas entre 0 y 250 mM, debiendo ser solubles en estas condiciones cuando menos a 0.1 mg/mL. En solución en medios neutros deben presentar carga negativa, fundamentalmente debida a grupos fosfato, que confieren una especial reactividad frente a células $\gamma\delta$ T (A Salerno, F Dieli "Role of $\gamma\delta$ T lymphocytes in immune response in humans and mice" Critical Rev: Immunol 18, 327-357 (1998)), con una relación de residuos fosfato por monosacárido entre 1 a 5 y 1 a 25; no deben presentar grupos sulfato ni carboxilato. En cuanto a su composición de monosacáridos, manosa debe ser el principal (al menos el 40%), siendo los otros glucosa y/o galactosa; el contenido en monosacáridos nitrogenados no debe superar el 5 % del total. El esqueleto principal debe estar formado por enlaces 1-6 con ramificaciones preferiblemente 1-2, y de modo que los monosacáridos en las ramificaciones no superen el 60 %. No deben presentar grupos lipídicos asociados.

En cuanto a su comportamiento fisico-químico, deben presentar dominios capaces de interactuar con octadecilsilano en medio acuoso y no deben gelificar en medios acuosos o salinos, en particular en presencia de calcio a concentraciones inferiores o iguales a 2 mM. Deben ser capaces de formar conjugados con polipéptidos o péptidos con las características descritas en el apartado siguiente, y dichos conjugados deben ser estables en condiciones fisiológicas.

No deben presentar actividad anticoagulante. Deben ser capaces

de resistir las condiciones físico-químicas y enzimáticas del tracto gastro intestinal, para garantizar así la actividad de los conjugados por vía oral; esta actividad viene originada a través de la interacción del conjugado con el tejido linfóide intestinal y la generación de una respuesta sistémica a través del puente de las células $\gamma\delta$ -T (AK Abbas, AH Lichtman, JS Pöber, "Cellular and molecular immunology," W.B. Saunders Co. Philadelphia, pp 232-236 (1994). TW Mak, DA Ferrick "The $\gamma\delta$ T-cell bridge: Linkage innate and acquired immunity" Nature Med. 4, 764-765 (1998)), puente que manifiesta un especial decaimiento en la vejez (G Pawelec, R Solana, E Remarque, E Mariani "Impact of aging on innate immunity" J. Leuk. Biol. 64, 703-712 (1998)).

B) Requisitos que deben cumplir las moléculas de naturaleza polipeptídica objeto de la presente invención:

Las moléculas de naturaleza polipeptídica objeto de la presente invención deben cumplir los siguientes paradigmas:

15 Deben ser capaces de resistir las condiciones físico-químicas y enzimáticas del tracto gastro intestinal, para garantizar así la actividad de los conjugados por vía oral.

20 Deben ser capaces de formar conjugados con polisacáridos con las características descritas en el apartado anterior, y dichos conjugados deben ser estables en condiciones fisiológicas.

Se consideran de particular interés aquellos polipéptidos estabilizados a través de puentes disulfuro o alternativamente estabilizados a través de manipulaciones químicas que conduzcan a la formación de puentes dimetileno.

25 Este tipo de estructuras presentan al mismo tiempo la estereoespecificidad propia de las polipéptidos con la estabilidad química propia de fármacos de bajo peso molecular.

30 Fuentes posibles de este tipo de moléculas son las polipéptidos de reserva de semillas vegetales, polipéptidos defensivos vegetales, polipéptidos edulcorantes vegetales, etc.

Para ello deben cumplir los siguientes requisitos:

.Peso molecular: Entre 4 y 30 KDa.

.Solubilidad: soluble en agua o en medios salinos, con fuerza iónica similares a las producidas por soluciones de cloruro sódico entre 0 y 0.25 M, a

concentraciones iguales o superiores a 0.1 mg/ml.

.En estado nativo deben ser resistentes a proteasas tipo tripsina, quimotripsina y/o pepsina, en las condiciones óptimas de trabajo de estas enzimas; en estado nativo deben ser resistentes a pH ácido (en condiciones similares a las del estómago), durante un tiempo no inferior a 1 hora.

.Deben ser capaces de resistir las condiciones físico-químicas y enzimáticas del tracto gastro intestinal, para garantizar así la actividad de los conjugados por vía oral; esta actividad viene originada a través de la interacción del conjugado con el tejido linfóide intestinal y la generación de una respuesta sistémica a través del puente de las células $\gamma\delta$ T (AK Abbas, AH Lichtman, JS Pober "Cellular and molecular immunology" W.B. Saunders Co. Philadelphia, pp 232-236 (1994). TVV Mak, DA Ferrick "The $\gamma\delta$ T-cell bridge: Linkage innate and acquired immunity" Nature Med. 4, 764-765 (1998)), puente que manifiesta un especial decaimiento en la vejez (G Pawelec, R Solana, E Remarque, E Mariani "Impact of aging on innate immunity" J. Leuk. Biol. 64, 703-712 (1998)).

.Cuando se desnaturalizan por agentes tales como cloruro de guanidina 8 M o urea 6 M y en presencia de agentes reductores de los puentes disulfuro, como ditiotretol o β mercaptoetanol a concentración 6.4 mM, deben ser capaces de recuperar el estado nativo, evaluado a partir de los espectros de dicroísmo circular en el rango 280-200 nm, por simple dilución de los agentes desnaturalizantes.

.Preferentemente no glicosilados.

.Estabilizados por puentes disulfuro o dimetileno, pudiendo ser oligoméricos, especialmente diméricos, y en ese caso debe haber por lo menos dos puentes disulfuro o dimetileno intercatenarios.

.Secuencia: Para que se cumplan las condiciones anteriores, las polipéptidos objeto de la presente invención deben incluir en su secuencia la siguiente secuencia de consenso:

$Z_{3-48} C Z_{9-13} C(Q,E,R,K)Z(Z_{\text{hidrofóbico}})(LIVM)Z_{15-39} CC(Z_{\text{hidrofílico}})(Q,E,H)(L,V)Z_6 CZC Z_2$
 30 $(L,I)Z_{13-56} G Z_{15-26} CZ(V,I,L,M)Z_{1-8} CZ_{1-12}$

(() Indica 1 aminoácido, estando dentro del paréntesis los posibles por orden de preferencia. Z_n indica n aminoácidos cualesquiera que sean. Esta secuencia tiene dominios CZ_nC (Tamaoki et al "Folding motifs induced and stabilized by distinct cystine frameworks" Protein engineering 11, 649-659 (1998))

35 En el caso de polipéptidos diméricos, la secuencia de consenso puede estar repartida entre las secuencias de las dos subunidades, lo que supone la

existencia de un punto de hidrólisis, que debe estar en alguna de las zona indicadas por Z_n de dicha secuencia.

Deben tener un efecto proliferativo significativo en un modelo de esplenocitos murinos (índice de proliferación 3 respecto al control). Se valora el efecto del tratamiento *in vitro* con los polipéptidos sobre células esplénicas de ratón Balb/c. El ensayo se realiza en microplaca y la proliferación se cuantifica por un método colorimétrico (T Mosmann "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays" J. Immunol. Methods 65, 55-63 (1983).

10 C) Formación de los conjugados polisacárido polipéptido:

La formación de los conjugados polisacárido polipéptido es un fenómeno espontáneo a temperatura ambiente a partir de soluciones de ambos componentes en agua o soluciones salinas cuya fuerza iónica no exceda la equivalente a la de una solución de cloruro sódico 0.15 M. Los conjugados polisacárido polipéptido pueden estar en el rango 1/1 a 1/19 mol/mol. Los conjugados se forman mezclando a temperatura entre 15 y 40°C y bajo agitación suave entre 1 y 100 rpm, soluciones de polipéptido y de polisacárido que contengan la cantidad deseada de cada uno de ellos (de modo que se cumplan las relaciones mol/mol indicadas) y en los medios indicados. La mezcla de las soluciones se mantiene bajo agitación un tiempo comprendido entre 5 y 60 minutos. Una vez formado el conjugado, éste puede ser administrado tal cual o en cualquier forma galénica adecuada, previa filtración esterilizante, en el caso de su uso por vía parenteral, intramuscular o subcutánea.

Es posible también formar conjugados entre un polisacárido y dos polipéptidos, siempre que se mantengan las proporciones polisacárido/total polipéptidos arriba indicadas, y se cumplan, además de las condiciones arriba indicadas, las siguientes condiciones:

- a) La razón entre los dos polipéptidos mol/mol esté entre 1/3 y 3/1.
- b) Los dos polipéptidos sean del mismo origen biológico.
- 30 c) Los dos polipéptidos presenten una homología de secuencia no inferior al 25% (y que la suma de homología estricta y sustituciones permitidas no sean inferior al 50%).

D) Formas galénicas

Forma farmacéutica Inyectable: El conjugado se dializa o diafiltra contra una solución salina estéril apirógena y se esteriliza por filtración por $0.22\ \mu$ en condiciones estériles apirógenas.

- 5 Formas orales: El conjugado puede ser administrado en solución tal cual se obtiene o a partir de una solución extemporánea del conjugado liofilizado en agua, y también en cualquier forma galénica farmacéutica convencional, tales como tabletas, comprimidos o cápsulas, jarabes o cualquier forma farmacéutica líquida de uso oral, empleando los excipientes necesarios.

- 10 Formas farmacéuticas tópicas: El conjugado se puede formular en preparaciones tópicas en concentraciones entre el 1 y el 5 % (p/p) en formas convencionales como geles, cremas, pomadas, empleando los excipientes farmacéuticos habituales.

Ejemplo 1.

1. Obtención del polisacárido.

- 15 Se obtiene, por ejemplo, basándose en los procedimientos descritos en G Kogan, J Sandula, V Simkovicova "Glucomannan from *Candida utilis*. Structural investigation" Folia Microbiol (Praha) 38, 219-224 (1993). KH Rademacher, Y Koch "(Structure of the cell wall mannans of synchronously multiplying *Candida utilis* cells)" Z. All. Mikrobiol 19, 65-67 (1979)), del siguiente modo:
- 20

En este ejemplo, el polisacárido, parte integrante del conjugado objeto de la presente invención, se obtiene a partir de *Candida utilis* desecada comercial para uso humano, por el método que a continuación se describe:

- 25 1.1. Pesar aproximadamente 100 g de semillas de soja. Ponerlas en remojo durante 24 horas en agua corriente.
- 1.2. Lavar las semillas varias veces.
- 1.3. Molerlas en mortero o en picadora.
- 1.4. Preparar una solución acuosa de 2 L conteniendo 6.25 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 3.33 g/L de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Atemperar a $37\ ^\circ\text{C}$. Añadir, bajo agitación en agitador

magnético, 0.21 g/L de MnO_2 , 62.5 g/L de *C. utilis* desecada y 12.5 g/L de la molienda de semillas.

1.5. Incubar en agitador orbital a 37 °C y 200 rpm durante 48 horas.

1.6. Dejar decantar, separar el sobrenadante y centrifugar a 2300 x g 10 minutos a temperatura ambiente. Filtrar el sobrenadante de la centrifugación por papel a vacío y por filtro de 0.45 μ .

1.7. Dializar contra 5 veces su volumen de agua MilliRO, durante 1 día a 4-8 °C, cambiando el agua entre 3 y 5 veces.

1.8. En caso de que aparezca precipitado, eliminarlo por centrifugación a 2300 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente.

1.9. Liofilizar, si se desea, los dializados o dializados centrifugados.

1.10. Purificar por métodos tradicionales, tales como cromatografía de permeación molecular (en geles tales como Sephacryl S-200 o S-400 o similares), ultrafiltración (por membranas de corte molecular 50.000 de Amicon o similares), etc.

1.11. Si se desea puede liofilizarse.

1.12. Mediante este procedimiento se obtiene un producto puro en cantidades en el rango entre 0.2 y 6.4 g polisacárido/100 mg levadura, lo que posibilita su escalado industrial.

El polisacárido así obtenido tiene un peso molecular promedio de 150 KDa \pm 30 KDa determinado por cromatografía líquida de alta eficacia de exclusión molecular en una columna TSK40, empleando como eluyente tampón: fosfato 10 mM NaCl 0.3 M pH 7.4 y detección por índice de refracción, comparando con dextranos patrones de Fluka como estándares de peso molecular. Presenta un contenido en fosfato de 1 residuo de fosfato por cada 15 residuos de monosacárido, determinado según el método de Hess y Deer (HH Hess, JE Deer "Assay of inorganic and organic phosphorus in the 0.1-5 nanomol range." Anal Biochem 63:607-613 (1975)). Su composición en monosacáridos determinada por hidrólisis, reducción, acetilación y cromatografía de gases de los derivados acetilados de alditol (según los métodos descritos en A Novotny "Basic exercises in Immunochemistry" S. Verlag Ed. Berlin, Heidelberg, New York pp. 127-131 (1979); G Keleti, WH Lederer "Handbook of Micromethods for the Biological Science" Ed. Van Nostrand Reinhold. New York. pp. 55-57. y HP Burchfield, EE Storrs "Biochemical Applications of Gas Chromatography" Academic Press. New York (1962)) es manosa 84 \pm 6 %, 20 25 30 35

glucosa 7 ± 3 % y galactosa 1 ± 1 %. El análisis estructural determinado por degradación de Smith (F Smith, R Montgomery Meth Biochem Anal 3:153 (1956)) demuestra que dicho polisacárido presenta un esqueleto lineal 1-6, en el que se encuentran el 45 ± 5 % de los monosacáridos, con ramificaciones 1-2, en las que se encuentran el 45 ± 5 % de los monosacáridos. No da positivas reacciones de carboxilato ni de sulfato. El polisacárido así obtenido interactúa con octadecilsilano cuando se inyecta en una columna de estas características en un medio acuoso (columna C18 Vydac) siendo necesario una concentración de al menos 25% de acetonitrilo para eluirlo. El polisacárido así obtenido no modifica ni su comportamiento cromatográfico en la columna TSK 40 anteriormente citada ni su contenido en fosfato tras una incubación de 1 hora en jugo gástrico incompleto (2 g/L NaCl, 7 mL/L ácido clorhídrico concentrado) a 37 °C, bajo agitación a 50 - 100 rpm. El polisacárido así obtenido no gelifica en presencia de cloruro cálcico a concentraciones inferiores a 10 mM. El polisacárido así obtenido no presenta actividad anticoagulante *in vitro* (TA Harper "Laboratory guide to disordered haemostasis" pp 76-77 Butterworths (1970)).

2. Obtención del polipéptido.

Se obtiene, por ejemplo, basándose en los procedimientos descritos por FS Sharief, SSL Li "Aminoacid sequence of small and large subunits protein from *Ricinus communis*" J. Biol. Chem. 257, 14753-14759 (1982); J Godinho da Silva Jr, OLT Machado, C Izumi, JC Padovan, BT Chait, UA Mirzaa, LJ Geene "Aminoacid sequence of a new 2S albumin which is part of a 29-kDa precursor protein" Arch. Biochem. Biophys. 336, 10-18 (1996); GM Neumann, R Condrón, GM Polya "Purification and sequencing of napin-like protein small and large subunits from *Momordica charantia* and *Ricinus communis* seeds and determination of sites phosphorylated by plant Ca^{2+} -dependent protein kinase" Biochem. Biophys. Acta 1298, 223-240 (1996); MEH Bashir, I Hubatsch, HP Leinenbach, M Zeppezauer, RC Panzani, IH Hussein "Ric c1 and Ric c 3, the allergenic 2S albumin storage proteins of *Ricinus communis*: Complete primary structures and phylogenetic relationships" Int. Arch. Allergy Immunol. 115, 73-82 (1998) del siguiente modo:

En este ejemplo, el polipéptido, parte integrante del conjugado objeto de la presente invención, se obtiene a partir de semillas no germinadas de *Ricinus communis*, por el método que a continuación se describe:

- 2.1. 100 g de semillas enteras, previamente lavadas con agua, se trituran hasta la obtención de una pasta no compacta.
- 2.2. La obtención del extracto se realiza agitando magnéticamente, la pasta con 500 ml de agua durante 18 h a 4°C.
- 5 2.3. A continuación, los restos de semillas se eliminan por filtración sucesiva a través de filtro de malla de acero inoxidable de 0,2 mm de luz, capa de Hyflo supercell y por prefiltro de polipropileno y filtros de nitrocelulosa o similares de 40 mm de diámetro y luz de 80 µm, 8 µm, 5 µm, 0,45 µm y 0,22 µm.
- 2.4. El filtrado se acidifica hasta pH 1.5 con ácido fosfórico diluido con agua
10 MilliQ al 50 % (v/v).
- 2.5. Se calienta a 56 °C en baño de agua con termostato durante 120 minutos; con agitación magnética suave.
- 2.6. Se centrifuga a 2300 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se separa cuidadosamente el sobrenadante, de modo que no se contamine con el
15 precipitado.
- 2.7. Se neutraliza el sobrenadante con solución de NaOH al 20% (p/v) hasta pH 7.0 ± 7.5.
- 2.8. Se centrifuga a 2300 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se separa cuidadosamente el sobrenadante, de modo que no se contamine con el
20 precipitado.
- 2.9. Se ultrafiltra el sobrenadante por membrana de 5000 Da de corte molecular hasta aproximadamente 1/2 de su volumen. Se añade agua MilliQ hasta volumen inicial y se ultrafiltra hasta 1/2 de su volumen. Se repite el proceso 4 veces.
- 2.10. El sobrenadante concentrado lavado resultante del paso anterior se
25 cromatografía en columna de fase reversa (Vydac C4), purificando el polipéptido que eluye con una concentración de acetonitrilo entre el 18 y el 22 %.
- 2.11. Se evapora el solvente por liofización y se elimina el exceso de sales por diafiltración o cromatografía en BioGel P10 o similar.
- 2.12. Si se desea puede liofilizarse.
- 30 2.13. Mediante este procedimiento se obtiene un producto puro en cantidades en el rango entre 0.2 y 1.0 g polipéptido/ 100 g semilla de *R. communis*, lo que posibilita su escalado industrial.

El polipéptido así obtenido tiene un peso molecular de 12 KDa ± 0.5 KDa, determinado por espectroscopia de masas, es dimérico, como se determina por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (H Schagger, G von Jagow "Tricine-sodium dodecyl sulfate

polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 KDa" Anal. Biochem. 166,368-379 (1987)), estando dichos dímeros unidos por puentes disulfuro, cual puede deducirse de la necesidad de emplear condiciones reductoras para la resolución por electroforesis; es resistente a tripsina (incubada 24 horas a 37 °C en Tris-HCl 0.1M pH 8.5 en una relación polipéptido proteasa 30:1), pepsina (incubada 24 horas a 37 °C en HCl 0.01M en una relación polipéptido proteasa 25:1) y cumple el resto de las condiciones descritas en la Descripción General de la Invención. Su secuencia, determinada por degradación de Edman es la siguiente:

10 Subunidad menor ESKGEREGSSSQCRQEVQRKDLSSCERYLRQSSRR
 Subunidad mayor QQQESQQLQQCCNQVKQVRDECQCEAIKYIAEDQIQQG
 QLHGEESEVAQRAGEIVSSCGVRCMRQTR

(están subrayados los aminoácidos especificados en la secuencia de consenso)

El polipéptido así obtenido induce *per se* la proliferación de las
 15 células esplénicas con un índice de proliferación máximo con un valor de 5 a la
 concentración de 3 µg/ml.

3. Formación del conjugado.

Se parte del polisacárido, obtenido como se indica en el punto 1 de
 este ejemplo, disuelto en agua a una concentración de 1 mg/mL, en un volumen
 20 total de 50 mL, y del polipéptido, obtenido como se indica en el punto 2 de este
 ejemplo, disuelto en agua a una concentración de 1 mg/mL, en un volumen total
 de 10 mL. Se vierte en un vaso y a temperatura ambiente 34 mL de la solución
 del polisacárido y 6.5 mL de la solución del polipéptido y se añade agua hasta
 un volumen final de 300 mL, se incorpora un imán y se agita a 50 rpm durante
 25 30 minutos. Transcurrido este tiempo se extraen alícuotas de 1 mL y se conserva
 congelado hasta su administración a los animales de experimentación.

4. Actividad biológica: Inhibición de la producción de factor de necrosis tumoral (TNF) inducido por endotoxina bacteriana (LPS) en suero de ratones Balb/c

El conjugado polisacárido-polipéptido se administra a ratones Balb/c
 30 por vía oral en un volumen de 0.5 mL de una solución preparada según se
 describe en el punto 3 durante seis días consecutivos previos a la inyección
 intravenosa de 25 µg por animal de endotoxina de *E. coli* serotipo 055:B5. El
 resultado que se obtiene con este tratamiento es una inhibición del 65% de los

niveles de TNF sérico obtenido 90 minutos después de la administración de LPS.

Ninguno de los dos componentes del conjugado polisacárido-polipéptido administrados individualmente a dosis similares a las que se encuentran en el conjugado presenta actividad en este ensayo.

- 5 El TNF se determina mediante un bioensayo en el que se mide la citotoxicidad del suero frente a la línea celular L929 (T Mosmann "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays" J. Immunol. Methods 65, 55-63 (1983).

Ejemplo 2.

10 1. Obtención del polisacárido.

A partir de *C. utilis*, tal y como se describe en el Ejemplo 1, apartado 1.

2. Obtención de la polipéptido.

- Se obtiene, por ejemplo, basándose en los procedimientos descritos:
- 15 por FS Sharief, SSE Li "Amino acid sequence of small and large subunits protein: from *Ricinus communis*" J. Biol. Chem. 257, 14753-14759 (1982); J Godinho da Silva Jr, OLT Machado, C Izumi, JC Padovan, BT Chait, UA Mirzaa, LJ Geene: "Amino acid sequence of a new 2S albumin which is part of a 29-kDa precursor protein" Arch. Biochem. Biophys. 336, 10-18 (1996); GM Neumann, R Condrón,
- 20 GM Polya "Purification and sequencing of napin-like protein small and large subunits from *Momordica charantia* and *Ricinus communis* seeds and determination of sites phosphorylated by plant Ca^{2+} -dependent protein kinase" Biochem. Biophys. Acta 1298, 223-240 (1996); MEH Bashir, I Hubatsch, HP Leinenbach, M Zeppezauer, RG Panzani, IH Hussein "Ric c1 and Ric c3, the
- 25 allergenic 2S albumin storage proteins of *Ricinus communis*: Complete primary structures and phylogenetic relationships" Int Arch Allergy Immunol. 115, 73-82 (1998) del siguiente modo:

En este ejemplo, el polipéptido, parte integrante del conjugado

objeto de la presente invención, se obtiene a partir de semillas no germinadas de *Ricinus communis*, por el método que a continuación se describe:

- 2.1. 100 g de semillas enteras, previamente lavadas con agua, se trituran hasta la obtención de una pasta no compacta.
- 5 2.2. La obtención del extracto se realiza agitando, con agitador magnético, la pasta con 500 ml de agua durante 18 h a 4°C.
- 2.3. A continuación, los restos de semillas se eliminan por filtración sucesiva a través de filtro de malla de acero inoxidable de 0,2 mm de luz, capa de Hyflo supercell y por prefiltro de polipropileno y filtros de nitrocelulosa o similares de
 - 10 40 mm de diámetro y luz de 80 µm, 8 µm, 5 µm, 0,45 µm y 0,22 µm.
 - 2.4. El filtrado se acidifica hasta pH 1.5 con ácido fosfórico diluido con agua MilliQ al 50 % (v/v).
 - 2.5. Se calienta a 56 °C en baño de agua con termostato durante 120 minutos, con agitación magnética suave.
 - 15 2.6. Se centrifuga a 2300 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se separa cuidadosamente el sobrenadante, de modo que no se contamine con el precipitado.
 - 2.7. Se neutraliza el sobrenadante con solución de NaOH al 20 % (p/v) hasta pH 7.0 - 7.5.
 - 20 2.8. Se centrifuga a 2300 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se separa cuidadosamente el sobrenadante, de modo que no se contamine con el precipitado.
 - 2.9. Se ultrafiltra el sobrenadante por membrana de 5000 Da de corte molecular hasta aproximadamente 1/2 de su volumen. Se añadir agua MilliQ hasta volumen
 - 25 inicial y se ultrafiltra hasta 1/2 de su volumen. Se repite el proceso 4 veces.
 - 2.10. El sobrenadante concentrado lavado resultante del paso anterior se cromatografía en columna de fase reversa (Vydac C4), purificando la polipéptido que eluye con una concentración de acetonitrilo entre 22 y 24%.
 - 2.11. Se evapora el solvente por liofización y se elimina el exceso de sales por
 - 30 diafiltración o cromatografía en BioGel P10 o similar.
 - 2.12. Si se desea puede liofilizarse.
 - 2.13. Mediante este procedimiento se obtiene un producto puro en cantidades en el rango entre 0.2 y 1.0 g polipéptido/ 100 g semilla de *R. communis*, lo que posibilita su escalado industrial.
 - 35 El polipéptido así obtenido tiene un peso molecular de 11 KDa ± 0.5

KDa, determinado por espectroscopía de masas, es dimérico, como se determina por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (H Schagger, G von Jagow "Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 5 1 to 100 KDa" Anal. Biochem. 166:368-379 (1987)) estando dichos dímeros unidos por puentes disulfuro, cual puede deducirse de la necesidad de emplear condiciones reductoras para la resolución por electroforesis; es resistente a tripsina (incubada 24 horas a 37 °C en Tris-HCl 0.1M pH 8.5 en una relación polipéptido proteasa 30:1), pepsina (incubada 24 horas a 37 °C en HCl 0.01M en 10 una relación polipéptido proteasa 25:1) y cumple el resto de las condiciones descritas en la Descripción General de la Invención. Su secuencia, determinada por degradación de Edman es la siguiente:

Subunidad menor PSQQGCRGQIQEQQLRQCQEYIKQQVSGQGPRR

Subunidad mayor QERSLRGCCDHLKQMQSQRCCEGLRQAIEQQQSQGQL
15 QGQDVFEAFRTAANLPSMCGVSPTECRF

(están subrayados los aminoácidos especificados en la secuencia de consenso)

El polipéptido así obtenido induce ~~per se~~ la proliferación de las células esplénicas con un índice de proliferación máximo con un valor de 4 a la 20 concentración de 6 µg/mL.

20 3. Formación del conjugado.

Se parte del polisacárido, obtenido como se indica en el punto 1 del ejemplo 1, disuelto en agua a una concentración de 1 mg/mL, en un volumen total de 50 mL. Se parte del polipéptido, obtenida como se indica en el punto 2 de este ejemplo, disuelta en agua a una concentración de 1 mg/mL, en un 25 volumen total de 10 mL. Se vierten en un vaso y a temperatura ambiente 34 mL de la solución del polisacárido y 6.5 mL de la solución del polipéptido y se añade agua hasta un volumen final de 300 mL, se añade un imán y se agita a 50 rpm durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se extraen alícuotas de 1 mL y se conserva congelado hasta su administración a los animales de experimentación.

30 4. Actividad biológica: Inhibición de la producción de factor de necrosis tumoral (TNF) inducido por endotoxina bacteriana (LPS) en suero de ratones Balb/c

El conjugado polisacárido-polipéptido se administra a ratones Balb/c

por vía oral en un volumen de 0.5 mL de una solución preparada según se describe en el punto 3 durante seis días consecutivos previos a la inyección intravenosa de 25 µg por animal de endotoxina de *E. coli* serotipo 055:B5. El resultado que se obtiene con este tratamiento es una inhibición del 55% de los niveles de TNF sérico obtenido 90 minutos después de la administración de LPS.

Ninguno de los dos componentes del conjugado polisacárido-polipéptido administrados individualmente a dosis similares a las que se encuentran en el conjugado presenta actividad en este ensayo.

El TNF se determina mediante un bioensayo en el que se mide la citotoxicidad del suero frente a la línea celular L929 (T Mosmann "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays" J. Immunol. Methods 65, 55-63 (1983).

Ejemplo 3.

1. Obtención del polisacárido.

A partir de *C. utilis*, tal y como se describe en el Ejemplo 1, apartado 1.

2. Obtención de las polipéptidos.

Se obtiene, por ejemplo, basándose en los procedimientos descritos por FS Sharief, SSL Li "Aminoacid sequence of small and large subunits protein from *Ricinus communis*" J. Biol. Chem. 257, 14753-14759 (1982); J Godinho da Silva Jr, OLT Machado, C Izumi, JC Padovan, BT Chait, UA Mirzaa, LJ Geene "Aminoacid sequence of a new 2S albumin which is part of a 29-kDa precursor protein" Arch. Biochem. Biophys. 336, 10-18 (1996); GM Neumann, R Condrón, GM Polya "Purification and sequencing of napin-like protein small and large subunits from *Momordica charantia* and *Ricinus communis* seeds and determination of sites phosphorylated by plant Ca^{2+} -dependent protein kinase" Biochem. Biophys. Acta 1298, 223-240 (1996); MEH Bashir, I Hubatsch, HP Leinenbach, M Zeppezauer, RC Panzani, IH Hussein "Ric c1 and Ric c 3, the allergenic 2S albumin storage proteins of *Ricinus communis*: Complete primary structures and phylogenetic relationships" Int. Arch. Allergy Immunol. 115, 73-82 (1998) del siguiente modo:

En este ejemplo, los polipéptidos, parte integrante del conjugado objeto de la presente invención, se obtienen a partir de semillas no germinadas de *Ricinus communis*, por el método que a continuación se describe:

- 2.1. 100 g de semillas enteras, previamente lavadas con agua, se trituran hasta la obtención de una pasta no compacta.
- 2.2. La obtención del extracto se realiza agitando, con agitador magnético, la pasta con 500 mL de agua durante 18 h a 4°C.
- 2.3. A continuación, los restos de semillas se eliminan por filtración sucesiva a través de filtro de malla de acero inoxidable de 0,2 mm de luz, capa de Hyflo supercell y por prefiltro de polipropileno y filtros de nitrocelulosa o similares de 40 mm de diámetro y luz de 80 µm, 8 µm, 5 µm, 0,45 µm y 0,22 µm.
- 2.4. El filtrado se acidifica hasta pH 1.5 con ácido fosfórico diluido con agua MilliQ al 50 % (v/v).
- 2.5. Se calienta a 56°C en baño de agua con termostato durante 120 minutos con agitación magnética suave.
- 2.6. Se centrifuga a 2300 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se separa cuidadosamente el sobrenadante, de modo que no se contamine con el precipitado.
- 2.7. Se neutraliza el sobrenadante con solución de NaOH al 20 % (p/v) hasta pH: 7.0 - 7.5.
- 2.8. Se centrifuga a 2300 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se separa cuidadosamente el sobrenadante, de modo que no se contamine con el precipitado.
- 2.9. Se ultrafiltra el sobrenadante por membrana de 5000 Da de corte molecular hasta aproximadamente 1/2 de su volumen. Se añade agua MilliQ hasta volumen inicial y se ultrafiltra hasta 1/2 de su volumen. Se repite el proceso 4 veces.
- 2.10. A continuación se purifica por cromatografía de permeación molecular en BioGel P10, recogiendo la zona, con volumen de elución inferior al total, que da positiva para la reacción de Lowry (OH Lowry, HJ Rosenbrough, AL Farr, RJ Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)) y despreciando lo que eluye a un volumen igual o mayor que el total del lecho.
- 2.11. Si se desea puede liofilizarse.
- 2.12. Mediante este procedimiento se obtiene una mezcla de los dos polipéptidos anteriormente descritos (ejemplos 1 y 2), en proporciones polipéptido 1/

polipéptido 2 en el rango 35/75 a 75/35 y en cantidades en el rango entre 0.4 y 1.2 g de ambas polipéptidos/ 100 g semillas de *R. communis*, lo que posibilita su escalado industrial.

- 5 Los polipéptidos así obtenidos inducen, cuando se administran conjuntamente en la relación obtenida (2/1 polipéptido 12KDa/ polipéptido 11 KDa), *per se* la proliferación de las células esplénicas con un índice de proliferación máximo con un valor de 6 a la concentración de 3 µg/ml.

3. Formación del conjugado.

- 10 Se parte del polisacárido, obtenido como se indica en el punto 1 del ejemplo 1, disuelto en agua a una concentración de 3.75 mg/mL, en un volumen total de 150 mL. Se parte de los polipéptidos, obtenidas como se indica en el punto 2 de este ejemplo, disueltas en agua a una concentración de 0.75 mg/mL, en un volumen total de 150 mL. En un vaso y a temperatura ambiente se colocan ambas soluciones, se añade un imán y se agita a 50 rpm durante 30 minutos.
- 15 Transcurrido este tiempo se congela, liofiliza y se guarda congelado hasta su administración a los animales de experimentación, en que se disuelve en agua destilada a la concentración adecuada para la dosis requerida.

- 20 El espectro infrarrojo del glicoconjugado así obtenido se muestra en la figura 1. Dicho espectro ha sido realizado en pastilla de bromuro de potasio, con una concentración del glicoconjugado del 0.2%, en un espectrofotómetro infrarrojo Perkin-Elmer modelo 881, barriendo desde 4000 a 600 cm⁻¹ en 6 minutos con rendija variable, resolución a 1000 cm⁻¹ y ruido espectral de 0.5% T y corregido electrónicamente por el procedimiento Savitzky/Golay y expandido automáticamente en absorbancia.

25 4. Actividad biológica.

Inhibición de la producción de factor de necrosis tumoral (TNF) inducido por endotoxina bacteriana (LPS) en suero de ratones Balb/c

- 30 El conjugado polisacárido-polipéptidos se administra a ratones Balb/c por vía oral en un volumen de 0.5 mL a una dosis de 3 mg/Kg durante seis días consecutivos previos a la inyección intravenosa de 25 µg por animal

de endotoxina de *E. coli* serotipo 055:B5. El resultado que se obtiene con este tratamiento es una inhibición del 65% de los niveles de TNF sérico obtenido 90 minutos después de la administración de LPS.

- 5 El TNF se determina mediante un bioensayo en el que se mide la citotoxicidad del suero frente a la línea celular L929 (T Mosmann "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays" J. Immunol. Methods 65, 55-63 (1983).

Efecto de diferentes dosis del conjugado polisacárido-polipéptidos sobre la producción de TNF inducido por LPS en suero de ratones

10

- Diferentes dosis del conjugado se administraron a los ratones con la misma pauta de tratamiento descrita anteriormente. El resultado indica que existe una relación dosis-efecto entre la inhibición del TNF y la dosis del conjugado. La curva dosis-efecto presenta forma de campana alcanzando un máximo de inhibición del 90% a la dosis de 48 mg/Kg.

15

Aumento de la actividad hematopoyética evaluada por el incremento en el número de células precursoras de la línea granulocito-macrófago (CFU-GM)

- La administración intravenosa de una única dosis 2 mg/Kg en un volumen de 0.25 mL del conjugado polisacárido-polipéptidos a ratones C57Bl/6 induce la formación de precursores de la línea granulocito-macrófago medidos a los cinco días de su administración.

20

- La administración intravenosa de los polipéptidos a dosis similar a la que presentan en el conjugado produce un incremento del 227% en el número de células precursoras CFU-GM. La administración individual por vía intravenosa del polisacárido a dosis equivalente a la que se encuentra en el conjugado no tuvo efecto en este ensayo. Cuando se administra el conjugado a la dosis descrita anteriormente la actividad aumenta hasta un 3763%.

25

Aumento de la supervivencia en ratones inmunosuprimidos e infectados con *Listeria monocytogenes*

30

La administración de 3 mg/Kg del conjugado en un volumen de 0.5

- 5 mL por vía oral a ratones Swiss durante seis días consecutivos previos a la infección produce una protección en ratones inmunosuprimidos con sílice e infectados con *L. monocytogenes*. La inmunosupresión es inducida por tratamiento con 120 mg/Kg de sílice administrados intraperitonealmente un día antes de provocar la infección. La protección se manifestó como un incremento de la dosis letal 50, que en los animales tratados con el conjugado alcanzó un valor similar al de los animales no inmunosuprimidos.

10 Restauración de la actividad citotóxica antitumoral de células NK de animales inmunocomprometidos

- 15 El tratamiento con 3 mg/Kg del conjugado en un volumen de 0.5 mL, durante cuatro días consecutivos aumenta la actividad NK en las células del bazo de ratones normales y la normaliza si está disminuida, como ocurre en el caso de ratones viejos y ratones inmunosuprimidos con ciclofosfamida a una dosis única de 180 mg/Kg.

Efecto sobre la funcionalidad de macrófagos en ratón

- 20 El conjugado administrado en un volumen de 0.2 mL a una dosis de 0.9 mg/Kg a ratones Balb/c por vía oral durante seis días consecutivos incrementa la capacidad fagocitaria y bactericida de macrófagos peritoneales frente a *Staphylococcus aureus* con una clara relación entre la duración del tratamiento y los niveles de respuesta observados.

Cuando los macrófagos se enfrentan al patógeno intracelular *Candida guilliermondii* se observa un aumento tanto en el índice fagocitario como en la capacidad microbicida.

25 Acción sobre el edema pulmonar inducido por endotoxina intranasal

Se indujo un edema pulmonar por instilación de 400 µg de LPS de *E. coli* 055:B5 de Sigma, evaluándose el edema por inspección visual de la superficie pulmonar a los 3 días de la administración. La administración intraperitoneal del conjugado a distintas dosis (en el rango de 0.9 a 4.5 mg/Kg)

en 0.5 mL de agua estéril apirógena diariamente desde el día de la administración del LPS hasta el del sacrificio del animal, produce una disminución clara de dicho edema, con una dosis eficaz 50 de 1.67 mg/Kg.

Ensayo de toxicidad aguda en ratón

- 5 La administración oral a ratones de la cepa CD1 de una dosis de 200 mg/Kg en 1 mL del conjugado polisacárido-polipéptidos no resultó tóxica ya que no provocó mortalidad ni alteraciones en el peso corporal ni tampoco en el peso ni en el aspecto macro o microscópico de los principales órganos vitales.

Acción sobre procesos de metabolización a nivel hepático

- 10 El conjugado administrado por vía oral a la dosis de 3 mg/Kg en 0.5 mL a ratas Sprague-Dowley no interfiere en el aclaramiento de antipirina. Administrado a una dosis tres veces superior en 0.5 mL por vía oral a ratas de la misma cepa durante seis días consecutivos no modifica el contenido en citocromo P450, citocromo b5 y NADPH citocromo c reductasa, no modifica
15 tampoco actividades enzimáticas de biotransformación asociadas a citocromo P450 (Fase I), ni a enzimas de conjugación de fase II en microsomas hepáticos de rata.

REIVINDICACIONES

1.- Glicoconjugados constituidos por la asociación, no covalente de polisacáridos con polipéptidos, caracterizados porque la fracción del polisacárido tiene un peso molecular entre 50 y 250 KDa, soportando grupos funcionales fosfato en el rango 1 de dichos grupos fosfato por entre 5 y 25 residuos de monosacárido, con un 40% de manosa y pudiendo ser los restantes glucosa y o galactosa, constituyente del esqueleto principal integrado por enlaces 1-6 con ramificaciones 1-2 no superiores al 60%; la fracción polipeptídica se caracteriza por comprender una secuencia de consenso determinada por $Z_{3-48}CZ_{9-13}$ C(Q,E,R,K)Z($Z_{\text{hidrofóbico}}$)(LIVM)Z₁₅₋₃₉CC($Z_{\text{hidrofílico}}$)(Q,E,H)(L,V)Z₆CZC Z₂(L,I)Z₁₃₋₅₆G₁₅₋₂₆CZ(V,I,L,M)Z₁₋₈CZ₁₋₁₂, donde los símbolos representan aminoácidos y los paréntesis indican el orden preferencial, y siendo Z_n n-aminoácidos cualesquiera;

2.- Glicoconjugados, según la reivindicación anterior, caracterizados por que la fracción polipeptídica puede estar constituida por uno o dos polipéptidos siempre que la razón entre los dos polipéptidos mol/mol esté entre 1/3 y 3/1.

3.- Glicoconjugados, según la reivindicación primera, caracterizados porque la fracción polipeptídica es un dímero de peso molecular 12 ± 0.5 KDa con las secuencias de aminoácidos seleccionadas entre:

Menor:

20 ESKGEREGSSSQCRQEVQRKDLSSCERYLRQSSSRR
PSQQGCRGQIQEQQLRQCQEYIKQQVSGQGPRR

Mayor:

QQQESQQLQQCCNQVKQVRDECQCEAIKYIAEDQIQQGQLHGEESERVAQR
A G E I V S S C G V R C M R Q T R
25 Q E R S T R G C C D H L K Q M Q S Q C R C E G I R Q A I E Q Q Q S Q G Q L
Q G Q D V F E A F R T A A N L P S M C G V S R T E C R F

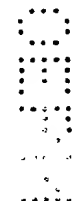
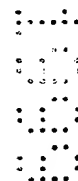
y donde se señalan los aminoácidos específicos de la secuencia de consenso, mediante subrayado.

4.- Glicoconjugados, según la reivindicación primera, caracterizados porque la fracción estructural polipeptídica se halla estabilizada por puentes

disulfuro o dimetileno pudiendo ser oligomérica o preferentemente dimérica, y en este caso disponiendo al menos dos puentes intercatenarios de disulfuro o dimetileno.

5.- Glicoconjugados, según la reivindicación primera, con actividad farmacológica y su aplicación en medicina para el tratamiento de desórdenes del sistema inmunológico.

6.- Glicoconjugados según la reivindicación primera y su aplicación en farmacia para su uso en la preparación de formas galénicas usuales.



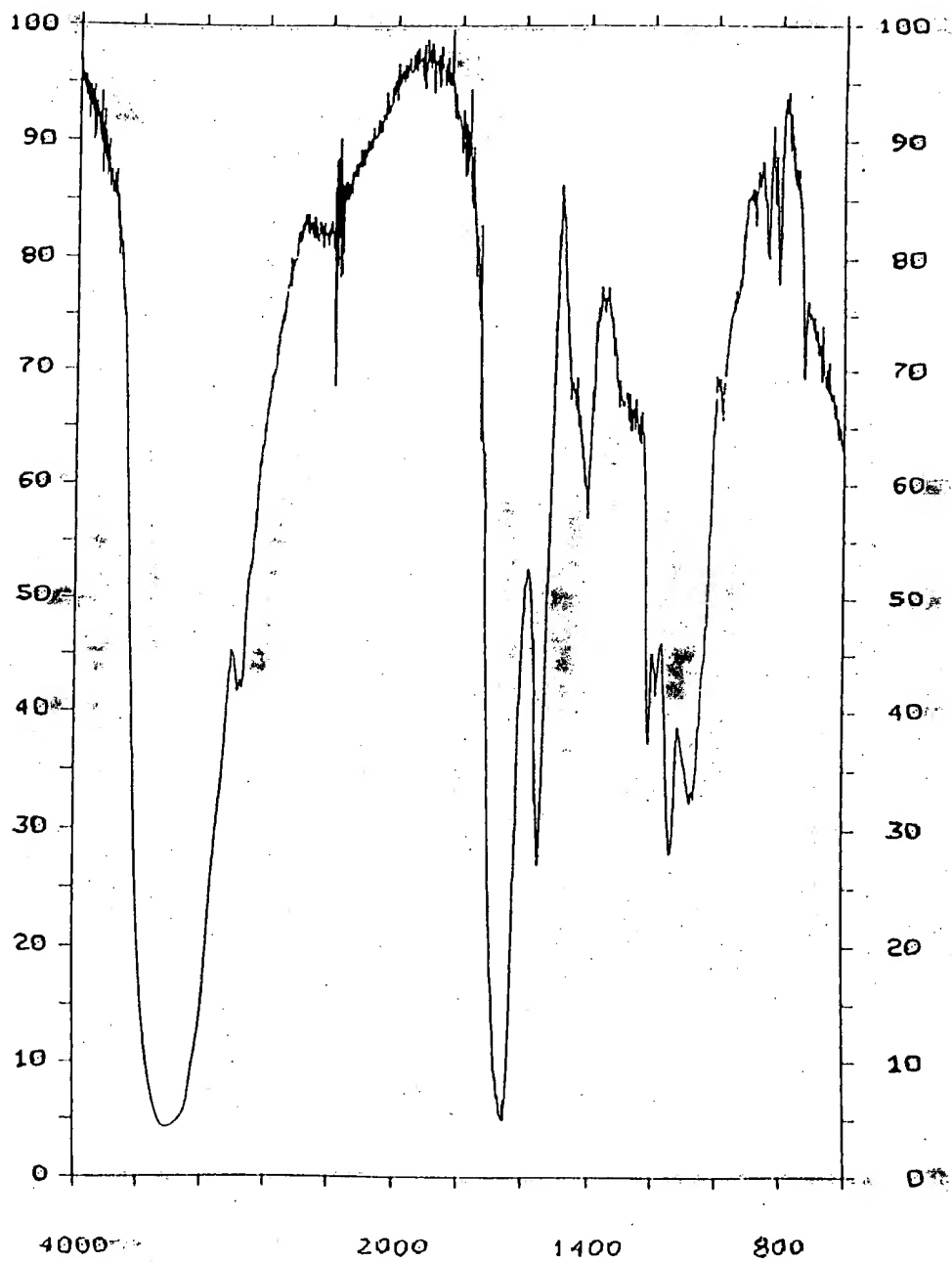
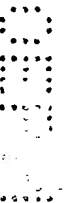
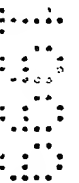


FIGURA 1

RESUMEN

GLICOCONJUGADOS DE POLIPÉPTIDOS FARMACOLÓGICAMENTE
ACTIVOS

5 Glicoconjugados de polipéptidos farmacológicamente activos con una determinada secuencia de consenso y estabilidad físico-química poseyendo una actividad *in vivo* que no es propia de los componentes aislados, con relevancia farmacológica y clínica, en función de su actividad inmunomoduladora. Con este fin son preparados para su uso en medicina humana y animal. Fig. 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)